Aus der Universitäts-Frauenklinik der Charité
(Dir. Prof. G. A. Wagner)

Die Wirkung der Hormone auf die fettspaltenden Fermente

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der

Medizinischen Doktorwürde

an der

Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Berlin

von

Dr. phil. Otto Mühlbock

aus Berlin

Tag der mündlichen Prüfung:

Tag der Promotion: 26. 5. 33.

Verlagsbuchhandlung Julius Springer in Berlin
1931

393

Gedruckt mit Genehmigung
der
Medizinischen Fakultät der Universität Berlin

Referent: Prof. Dr. G. A. Wagner

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Sonderabdruck aus der „Biochem. Zeitschrift", Band 238, Heft 4/6.

Bei den Versuchen, den Wirkungsmechanismus von Hormonen zu erklären, hat man bereits frühzeitig den Beziehungen zwischen Hormonen und Fermenten Beachtung geschenkt. Da, wie wir wissen, alle Umsetzungen im Organismus an die Mitwirkung von Fermenten gebunden sind, lag die Fragestellung nahe: Kann man aus der Beeinflussung bestimmter Fermente durch bestimmte Hormone schließen, daß hier ein Angriffspunkt der Hormonwirkung liegt?

Die Einwirkung eines bestimmten Hormons auf ein Ferment ist, soweit uns bekannt, nur von *Abderhalden* und *Franke*, *Weil* und *Landsberg*, *Simon* und *Weiner* untersucht worden. *Abderhalden* und *Franke* konnten zeigen, daß sowohl die Autolyse wie die Wirkung von Erepsin und Trypsin durch Zusatz von Thyroxin beschleunigt oder gehemmt werden kann, wobei für den Ausfall der Wirkung die angewandte Thyroxinmenge maßgebend ist. *Weil* und *Landsberg* bestätigen den Befund der Steigerung der Gewebsautolyse durch Thyroxin, während *Simon* und *Weiner* eine Beeinflussung der Leberautolyse durch Thyroxinzusatz nicht nachweisen konnten.

Über die Einwirkung von Hormonen auf die fettspaltenden Fermente (die Lipasen) liegen Mitteilungen bisher nicht vor. Es schien uns wichtig, diese Lücke auszufüllen, da gerade die Frage der hormonalen Regulation des Fettstoffwechsels zu den umstrittensten Gebieten hormonaler Stoffwechselwirkungen gehört. Die Möglichkeit, diese Untersuchungen zuverlässig durchzuführen, ist gegeben, da wir eine genaue Meßmethode für die Wirkung der Lipasen besitzen.

Wir fragen uns also: Läßt sich eine Beeinflussung fettspaltender Fermente durch Hormone nachweisen?

Um diese Frage beantworten zu können, haben wir die Wirkung der folgenden Hormone auf verschiedene fettspaltende Fermente untersucht[1].

1. Hypophyse. a) Vorderlappen: Prolan, Präphyson. b) Hinterlappen: Pituigan, Myopituigan, Vasopituigan, Pitocin, Pitressin, Orasthin und Tonephin.

2. Schilddrüse. a) Thyroxin (*Henning*) und Thyroxin (*Laroche*),

3. Pankreas. Insulin (*Wellcome*), Insulin (*Kahlbaum*), Kallikrein.

4. Nebeniere. Suprarenin, synth. Suprarenin org. (I. G.).

5. Weibliche Keimdrüse. Progynon, Follikulin, Hogival, Ovoglandol.

Aus den verschiedenen fettspaltenden Fermenten wählten wir: a) Fettgewebslipase, b) Pankreaslipase, c) Leberlipase, d) Placentalipase, e) Serumlipase.

Technik der Untersuchungen.

Für unsere Untersuchungen benutzten wir zur Bestimmung der lipatischen Wirkung zuerst die von *Rona* und *Michaelis* angegebene Methode. In einer Pufferlösung läßt man die Fermentlösung auf Tributyrin (Tributtersäure-Glycerinester) einwirken. Unter der Einwirkung der Lipase wird Tributyrin in Buttersäure und Glycerin gespalten. Die Geschwindigkeit der Spaltung ist ein Maß für die Wirksamkeit der Lipase. Der Verlauf der Spaltung wird durch die Bestimmung der Oberflächenspannung mittels der Tropfmethode gemessen. Tributyrin selbst hat eine große Oberflächenspannung, die Spaltprodukte dagegen beeinflussen die Oberflächenspannung kaum. Die Abnahme der Oberflächenspannung ist also ein Maß für die Konzentration des Tributyrins. Zu jedem Ansatz wurde diejenige Menge Lipaselösung benutzt, die in 60 Minuten eine vollständige Spaltung des Tributyrins bewirkte. (Die technischen Einzelheiten der bekannten Methodik siehe *Michaelis-Rona*, Praktikum der physiol. Chem.) Neben dieser Tropfmethode wurde für die im zweiten Teil unserer Arbeit angeführten Messungen der wirksamen Grenzkonzentrationen der Hormone die wesentlich genauere Methode der Lipasenbestimmung nach *Warburg, Rona, Lasnitzki* angewandt. Bei dieser Methode wird die Kohlensäuremenge gemessen, die durch die bei der Spaltung des Tributyrins frei werdende Buttersäure aus einer Natriumbicarbonatlösung austreibt. Durch die Benutzung der von *Warburg* angegebenen Apparatur gelingt es, sehr kleine Mengen von Kohlensäure genau zu bestimmen, so daß die Bestimmung der Wirkung der Lipasen an sehr kleinen Materialmengen durchgeführt werden kann. Die Exaktheit dieser Bestimmungsmethode ermöglicht ferner, sehr kleine Änderungen der Spaltungsgeschwindigkeit zu messen. (Die genaue Beschreibung der Methode findet sich ebenfalls bei *Michaelis-Rona*, Prakt. d. physiol. Chem., 4. Aufl., 1930.)

---

[1] Wir sind den Herstellerfirmen für die Überlassung von Versuchsmengen dankbar.

Für die Bestimmungen wurden die Lipasenlösungen in folgender Weise hergestellt:

1. Fettgewebslipase. Das bei der Operation gewonnene periphere Fettgewebe wird, zur Entfernung des Blutes, mehrmals mit physiologischer Kochsalzlösung gespült, in kleine Stücke geschnitten, im Mörser verrieben und mit der gleichen Gewichtsmenge physiologischer Kochsalzlösung 24 Stunden im Eisschrank unter häufigem Umschütteln stehengelassen. Dann wird filtriert. Im allgemeinen werden zu jedem Ansatz bei der Tropfmethode 2,5 ccm des Filtrats benutzt.

2. Placentalipase. Die Placenta wurde in der gleichen Weise wie das Fettgewebe aufgearbeitet.

3. Pankreas- und Leberlipase. Vom menschlichen Leichenmaterial stammendes Pankreas und Leber werden nach dem von *Willstätter* angegebenen Verfahren aufgearbeitet. Nach dem Zerkleinern der Drüsen werden diese mehrmals mit Aceton und Äther getrocknet. Von diesem Trockenpulver bereitet man sich mit n/40 Ammoniak einen Auszug, von dem diejenige Menge zum Versuch benutzt wurde, die bei den Tropfbestimmungen in 60 Minuten eine vollständige Spaltung des Tributyrins bewirkt.

4. Serumlipase. Im Tropfversuch wurde im allgemeinen 0,5 ccm Serum ohne Aufarbeitung verwandt. In einem besonderen Versuch, der auf S. 382 angeführt wird, wurde die Serumlipase nach folgendem von *Rona* und *Petow* angegebenen Verfahren gereinigt: 2 ccm Serum werden mit 2 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt. Die ausfallenden Globuline reißen einen großen Teil der Lipasen mit. Man zentrifugiert scharf ab und löst den verbleibenden, mehrere Male gewaschenen Niederschlag in 2 ccm Glycerin. 1 ccm dieses Glycerinauszuges wird zur Bestimmung benutzt.

A. Ergebnisse nach der Tropfmethode.

Bei der Bestimmung der Hormonwirkung auf die Lipasen nach der Tropfmethode, die einen orientierenden Überblick vermitteln sollte, benutzten wir 1 ccm der im Handel befindlichen Hormonlösung. Als Beispiel seien hier zwei Versuchsprotokolle wiedergegeben; die Ergebnisse der anderen Versuche sind in der beiliegenden Tabelle zusammengestellt.

Versuch 1, Wirkung des Thyroxins. Ansatz: 9 ccm Tributyrinpufferlösung und 2,5 ccm Fettgewebsextrakt.

Tropfenzahl

Minuten	Kontrolle + 1 ccm H_2O	Hormonversuch + 0,5 mg Thyroxin in 1 ccm H_2O
0	145	145
10	138	141
20	132	142
30	124	142
40	118	140
50	118	140
60	116	140

In dem Kontrollversuch haben wir eine Abnahme der Tropfenzahl von 145 auf 116 Tropfen. In dem Versuch mit Thyroxin dagegen von 145 auf 140 Tropfen. Es ergibt sich also eine deutliche Hemmungswirkung des Thyroxins auf die Fettgewebslipase. Um auszuschließen, daß diese Wirkung nicht auf andere der Handelslösung zugesetzte Stoffe zurückzuführen ist, haben wir die Wirkung einer reinen Thyroxinlösung geprüft.

Versuch 1a. Ansatz wie in Versuch 1. 1,5 mg reines Thyroxin wurde in 2 ccm Wasser unter tropfenweisem Zusatz von n/10 Natronlauge in Lösung gebracht. 1 ccm dieser Thyroxinlösung wurde zu demTropfversuch benutzt.

Tropfenzahl

Minuten	Kontrolle + 1 ccm H_2O	Hormonversuch + 1 ccm Thyroxinlösung
0	155	155
10	145	150
20	132	147
30	127	145
40	122	145
50	119	144
60	117	144

Wir sehen, daß in diesem Versuch 1a die prinzipiell gleiche Wirkung eintritt wie in Versuch 1, daß also die Hemmung der lipatischen Spaltung eine Wirkung des zugesetzten Thyroxins ist.

Versuch 2. Zusatz von Follikulin. Ansatz wie in Versuch 1.

Tropfenzahl

Minuten	Kontrolle + 1 ccm H_2O	Hormonversuch + 1 ccm Follikulin 100 M.-E.
0	136	134
5	131	129
10	125	124
15	121	121
20	117	117
30	113	113
40	112	111
50	110	109
60	109	109

Dieser Versuch zeigt, daß der Spaltungsverlauf der Fettgewebslipase durch Zusatz von 100 Einh. Follikulin nicht beeinflußt wird.

Wir haben uns gefragt, ob die verschiedenartige Wirkung zwischen Thyroxin und den übrigen untersuchten Hormonen auf rein physikalisch-chemischen Zustandsänderungen beruhen könne, die von der in den verschiedenen Hormonlösungen vorhandenen Trockensubstanzmenge abhängen. *Abderhalden* und *Franke* haben in ihren Versuchen mit Thyroxin die hemmende Beeinflussung der Spaltung mit Erepsin und mit Trypsin durch eine Trübung bzw. Ausflockung der Fermentlösung bei höherer Thyroxinkonzentration erklärt. Wir haben die

Trockensubstanzmengen bei Thyroxin und Follikulin bestimmt und gefunden, daß die Trockensubstanzmenge in 1 ccm Follikulin wesentlich größer ist als in der entsprechenden Menge Thyroxinlösung. 1 ccm Thyroxinlösung enthält 1 mg Trockensubstanz, in 1 ccm Follikulin fanden wir 7 mg Trockensubstanz. Insulin — Wellcome —, das wie Follikulin keine Wirkung auf die Lipasen besitzt, enthält in 1 ccm = 1,1 mg. Da zwischen der Menge an Trockensubstanz in der benutzten Hormonlösung und der Wirkung auf die Lipasen kein Zusammenhang besteht, kann somit die Hemmung der lipolytischen Wirkung in unseren Versuchen nicht mit der Menge der zugeführten Trockensubstanz erklärt werden.

Weiterhin mußte ausgeschlossen werden, daß durch den Hormonzusatz Änderungen im p_H der Flüssigkeit auftreten, welche die Änderungen der Lipolyse bedingen. In Kontrollmessungen überzeugten wir uns, daß durch die zugesetzten Mengen von Hormonlösung keine p_H-Änderung eintritt. Die hemmende Wirkung des Thyroxins auf die Lipolyse ist also durch das Hormon selbst bedingt. Daß es sich hierbei um einen spezifischen Effekt handelt, schließen wir weiter daraus, daß die Affinität des Thyroxins zum Ferment von uns nachgewiesen ist (s. S. 386).

Nr.	Hormon	Lipasen				
		Serum	Fettgewebe	Pankreas	Leber	Placenta
1	Suprarenin hydrochlor. synth. 1 : 1000	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —
2	Suprarenin organ.	—	—	—	—	—
3	Thyroxin (*Henning*) 1 ccm : 1 mg	—	++++	+++	+++	++
4	Thyroxin (*Laroche*) 1 ccm : 1 mg	—	++++	+++	++	++
5	Insulin (*Wellcome*) 1 ccm : 20 Einh.	—	—	—	—	—
6	Insulin (*Kahlbaum*) 1 ccm : 20 Einh.	—	—	—	—	—
7	Kallikrein	++++	—	—	+	—
8	Prolan 1 ccm = 50 R.-Einh.	—	—	—	—	—
9	Präphyson	+	+	—	++	+
10	Pituigan	+	—	—	—	—
11	Myopituigan	—	—	—	—	—
12	Vasopituigan	—	—	—	—	—
13	Pitocin	+	— —	—	—	—
14	Pitressin	—	—	—	—	—
15	Tonephin	—	—	—	—	—
16	Orasthin	—	—	—	—	—
17	Hogival	++	—	—	—	—
18	Follikulin	—	—	—	—	—
19	Progynon	—	—	—	—	—
20	Ovoglandol	+	—	—	—	—
21	Luteoglandol	—	—	—	—	—

In der vorigen Tabelle sind die Ergebnisse über die Wirkung sämtlicher untersuchter Hormone auf die verschiedensten Lipasen zusammengestellt. Eine totale Hemmung der lipatischen Wirkung wird mit ++++ bezeichnet. Eine geringere Wirkung der Hormone wird durch eine geringere Anzahl von Kreuzen gekennzeichnet. Keine Beeinflussung durch — — —.

Wir sehen, daß bei dieser Versuchsanordnung von sämtlichen untersuchten Hormonen *nur das Thyroxin* eine deutliche Wirkung auf die Fettgewebslipase und zwar im Sinne einer Hemmung ausübt. Ein geringer Einfluß ist beim Präphyson nachweisbar. Die verschiedenen brunstauslösenden Ovarialhormone üben keinerlei Wirkung auf die Fettgewebslipase aus. Die Lipasen der Placenta, des Pankreas und der Leber werden in gleicher Weise beeinflußt wie die Fettgewebslipase. Auch bei diesen Lipasen zeigt nur das Thyroxin eine starke Wirkung, das Präphyson eine schwächere, alle anderen Hormone werden unter diesen Bedingungen nicht beeinflußt. Ganz anders verhält sich bei diesen Versuchen die Serumlipase. Die Serumlipase wird durch die verschiedensten Hormone in leichtem Grade gehemmt, Kallikrein zeigt eine starke Wirkung.

Wir haben bereits darauf hingewiesen, daß sich auf Hormonzusatz die Serumlipase den Gewebslipasen gegenüber völlig verschiedenartig verhält. Bemerkenswert ist, daß Thyroxin auf die Serumlipase keinen Einfluß ausübt. Da es sich bei der Serumlipase nicht nur um eine spezifische Lipase, sondern um ein Gemisch ausgeschwemmter Organlipasen handelt, mußte man erwarten, daß Thyroxin auch die Serumlipase beeinflußt. In der Annahme, daß die Begleitsubstanzen im Serum die Wirkung des Thyroxins unterdrücken, haben wir eine Reinigung der Serumlipase von den meisten Begleitstoffen nach der Vorschrift von *Rona* und *Petow* (wie auf S. 379 angegeben) vorgenommen. Die von ihren Ballaststoffen befreite Serumlipase wurde in der Tat von Thyroxin beeinflußt, wie folgender Versuch zeigt.

Versuch 3. Wirkung des Thyroxins auf die gereinigte Serumlipase. Ansatz: 9 ccm Tributyrinpufferlösung und 1 ccm gereinigte Serumlipaselösung.

Minuten	Kontrolle + 1 ccm H_2O	Hormonversuch + 1 ccm Thyroxin
0	145	145
5	140	140
10	134	137
15	128	133
20	123	128
30	115	124
40	109	120
50	105	115
60	104	113

Vergleichen wir den Ausfall dieses Versuchs mit Versuch 1 mit Fettgewebslipase, so fällt auf, daß bei der gereinigten Serumlipase die Wirkung des Thyroxins wesentlich schwächer ist. Doch ist eine Hemmungswirkung deutlich erkennbar.

Wenn es an sich schon schwierig ist, aus Modellversuchen irgendwelche Rückschlüsse auf das Geschehen im menschlichen Organismus zu ziehen, so verbietet sich dieses für die bisher mitgeteilten Hormonversuche allein durch die von uns verwandte Hormonkonzentration. Wir mußten daher an die Frage herangehen: In welchen Grenzkonzentrationen beeinflussen die untersuchten Hormone die fermentative Wirkung? Zu diesen Untersuchungen benutzen wir die Methode von *Warburg-Rona-Lasnitzki*, die bei kleinen Fermentmengen außerordentlich exakte Werte liefert.

Bei der Ausführung der Methode hielten wir uns an die Originalvorschrift. Unsere Versuche führten wir zuerst mit Thyroxin und der Fettgewebslipase durch. Um die Art unserer Ansätze näher zu charakterisieren, geben wir ein ausführliches Versuchsprotokoll wieder.

Versuchsprotokoll.

Versuch 10. Bestimmung mit Fettgewebslipase. Darstellung des Extrakts wie auf S. **379** angegeben. Bereitung der Ringer- und Tributyrinlösung genau nach der Originalvorschrift. R_{20} = 100 ccm Ringerlösung mit 20 ccm Natriumbicarbonatlösung versetzt. Bestimmung im *Nikolai*-Trog. Die Zahlen bedeuten Manometerablesung, die Zahlen in Klammern bedeuten die entstandenen frei gewordenen CO_2-Mengen in Kubikmillimeter.

Minuten	Apparat Nr. 1 1,5 ccm R_{20}	Apparat Nr. 2 0,8 ccm R_{20}, 0,5 ccm Tributyrinlösung, 0,2 ccm Fettextrakt, 1,2 mg Thyroxin	Apparat Nr. 3 0,8 ccm R_{20}, 0,5 ccm Tributyrinlösung, 0,2 ccm Fettextrakt	Apparat Nr. 4 0,8 ccm R_{20}, 0,5 ccm Tributyrinlösung, 0,2 ccm Fettextrakt, 1,6 mg Thyroxin	Apparat Nr. 5 0,8 ccm R_{20}, 0,5 ccm Tributyrinlösung, 0,2 ccm Fettextrakt	Apparat Nr. 6 0,8 ccm R_{20}, 0,5 ccm Tributyrinlösung, 0,2 ccm Fettextrakt
10	8,5	6,75 (6,4)	9,8 (7,6)	10,1 (5,7)	10,15 (6,6)	9,0 (6,9)
20	8,6	7,3 (8,8)	10,6 (11,5)	10,6 (8,0)	11,0 (10,7)	9,8 (11,1)
30	8,7	7,9 (11,5)	11,5 (16,0)	11,1 (10,3)	11,95 (15,4)	10,65 (15,6)
40	8,9	8,55 (14,0)	12,45 (20,2)	11,7 (12,6)	12,9 (19,5)	11,6 (20,2)
50	9,0	9,05 (16,4)	13,35 (25,0)	12,2 (14,2)	13,85 (24,5)	12,5 (25,2)
60	9,15	9,55 (18,2)	14,2 (28,6)	12,7 (16,8)	14,7 (28,0)	13,3 (28,8)
70	9,30	10,1 (20,4)	15,2 (33,3)	13,2 (18,8)	15,75 (33,0)	14,25 (33,6)
80	9,35	10,6 (22,8)	16,05 (37,8)	13,6 (20,8)	16,6 (37,4)	15,05 (38,1)
90	9,5	11,1 (24,8)	16,9 (41,8)	14,0 (22,2)	17,5 (41,5)	15,9 (42,3)
100	9,55	11,55 (27,0)	17,8 (46,5)	14,45 (24,6)	18,3 (45,7)	16,7 (47,0)
110	9,6	11,95 (29,0)	18,6 (50,7)	14,8 (26,2)	19,25 (50,5)	17,6 (52,0)
120	9,65	12,4 (31,0)	19,5 (55,5)	15,25 (28,5)	20,0 (55,0)	18,4 (56,5)

Die Ergebnisse dieses Protokolls seien der besseren Übersichtlichkeit wegen in Kurvenform wiedergegeben (Abb. 1). Auf der Abszisse sind die

Minuten aufgetragen, auf der Ordinate die CO_2-Mengen in Kubikzentimetern, die das Maß für die lipatische Wirkung darstellen.

Aus der Kurve geht mit Deutlichkeit die starke Hemmung der lipatischen Wirkung durch Thyroxin hervor.

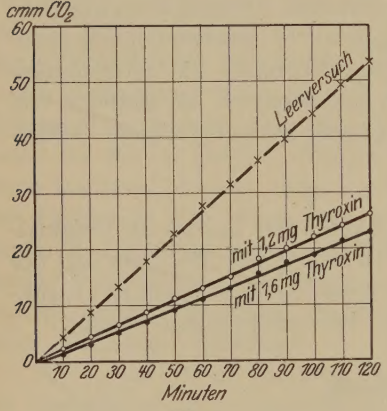

Abb. 1.

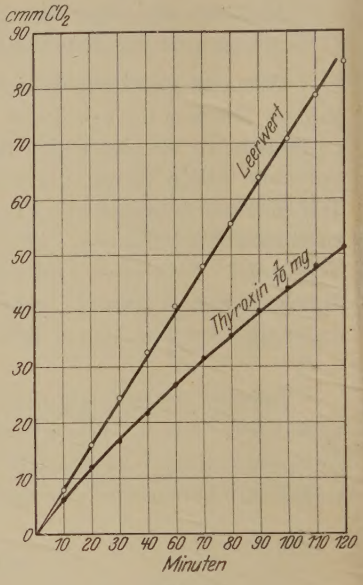

Abb. 2.

Um die Grenzkonzentration des Thyroxins zu ermitteln, wechselten wir in den nächsten Versuchen, die wir nur in Kurvenform wiedergeben, die Thyroxinkonzentration. Während wir in dem Versuch 10 das Thyroxin als Trockensubstanz zugegeben haben, benutzten wir zu den weiteren Versuchen eine Lösung von Thyroxin in Wasser unter Zugabe von soviel n/10 Natronlauge, bis eine klare Lösung eintritt. Durch entsprechende Verdünnungen mit Wasser wurden daraus die Versuchslösungen dargestellt. Die Vergleichsbestimmungen wurden mit der entsprechenden Menge verdünnter Natronlaugelösung angesetzt.

Aus diesen Kurven geht hervor, daß Thyroxin in einer Konzentration von $1 : 10^7$ noch eine deutliche Wirkung im Sinne einer Hemmung ausübt. Noch schwächere Konzentrationen (geprüft wurde $1 : 10^{10}$ und $1 : 10^{12}$) zeigten keine Beeinflussung der lipatischen Wirkung weder im Sinne einer Hemmung, noch im Sinne einer Beschleunigung. Eine Umkehr der Wirkung des Thyroxins in Abhängigkeit von seiner Konzentration, wie sie *Abderhalden* und *Franke* in ihren Versuchen mit Trypsin und Erepsin nachgewiesen haben, konnten wir bei der Beeinflussung des Lipolyse nicht feststellen.

Bei den Untersuchungen in der *Warburg*schen Apparatur zeigte sich, daß auch andere Hormone als das Thyroxin die Lipolyse beeinflussen. Eingehender untersucht wurde das Insulin und das Progynon. Doch unterscheiden sich diese Hormone in ihrer Wirkung von dem

Thyroxin sehr wesentlich durch die Konzentration, die man anwenden muß, um eine Beeinflussung der Lipase zu erzielen. Wir geben von unseren Protokollen nur je eines für das Insulin und das Progynon wieder, die die Konzentrationen zeigen, in der diese Hormone gerade noch wirksam sind. Für das Insulin ist die eben wirksame Menge $1 : 10^5$, für das Progynon ebenfalls $1 : 10^5$.

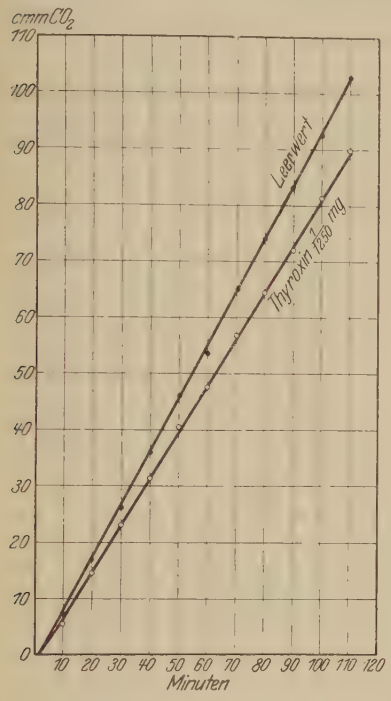

Abb. 3.

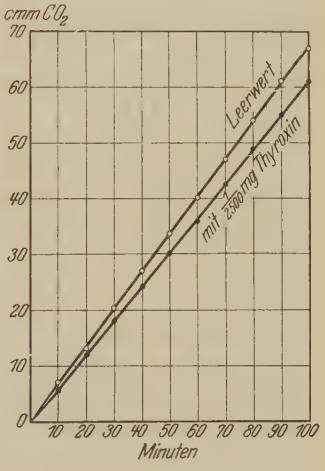

Abb. 4.

Versuch 42 mit Insulin (Wellcome). Ansatz wie bei Versuch 10.

Minuten	Apparat Nr. 3 1,5 ccm R_{20} Thermobarometer	Apparat Nr. 2 0,9 ccm R_{20}, 0,25 ccm Tributyrinlösung, 0,25 ccm Fettextrakt, 0,1 ccm Insulinlösung = 2 Einh.		Apparat Nr. 1 0,25 ccm Fettextrakt, 0,25 ccm Tributyrinlösung, 1 ccm Insulinlösung = 0,02 Einh.		Apparat Nr. 1 1 ccm R_{20}, 0,25 ccm Fettextrakt, 0,25 ccm Tributyrinlösung		Apparat Nr. 5 0,99 ccm R_{20}, 0,25 ccm Fettextrakt, 0,25 ccm Tributyrinlösung, 0,01 ccm Insulinlösung = 0,2 Einh.		Apparat Nr. 6 0,9 ccm R_{20}, 0,25 ccm Fettextrakt, 0,25 ccm Tributyrinlösung, 0,1 ccm Insulinlösung = 2 Einh.	
5	9,3	10,65	(6,6)	10,55	(6,75)	9,05	(6,9)	10,4	(6,3)	8,9	(6,6)
10	9,3	11,4	(10,7)	11,4	(11,3)	9,95	(11,8)	11,35	(11,6)	9,7	(11,4)
20	9,5	12,9	(17,9)	13,4	(21,1)	11,8	(20,9)	13,05	(19,6)	11,4	(20,4)
30	9,7	14,4	(25,0)	15,2	(29,7)	13,6	(29,7)	14,8	(28,4)	13,1	(29,4)
40	9,85	15,8	(31,9)	16,95	(38,4)	15,4	(38,8)	16,5	(37,0)	14,75	(38,4)
50	9,85	17,15	(39,4)	18,7	(47,8)	17,1	(48,2)	18,2	(46,2)	16,4	(48,3)
60	9,9	18,5	(46,5)	20,5	(57,3)	18,7	(57,3)	19,8	(55,0)	17,9	(57,0)
70	10,5	20,05	(54,3)	22,3	(66,3)	20,55	(66,0)	21,55	(63,5)	19,6	(66,3)
80	10,1	21,45	(61,5)	24,1	(75,5)	22,15	(74,5)	23,1	(72,0)	21,1	(75,0)
90	10,3	22,9	(68,5)	25,95	(84,5)	23,9	(83,0)	24,9	(80,5)	22,85	(84,3)
100	10,4	24,35	(76,0)	27,65	(93,0)	25,5	(91,5)	26,4	(88,5)	24,5	(93,5)
110	10,75	25,85	(82,0)	30,0	(100,4)	27,5	(100,5)	28,6	(98,5)	26,2	(102,0)

Versuch 40 mit Progynon. Ansatz wie bei Versuch 10. Das Progynon wird in Aceton gelöst in die Tröge eingefüllt, und dann Aceton langsam fortgedampft. In dem Leerversuch wird die gleiche Menge reines Aceton eingefüllt und dann auf dieselbe Weise verdampft.

Minuten	Apparat Nr. 3 1,5 ccm R_{20} Thermobarometer	Apparat Nr. 2 1 ccm R_{20}, 0,25 ccm Tributyrinlösung, 0,25 ccm Fettextrakt, 0,1 ccm Aceton		Apparat Nr. 1 1,25 ccm R_{20}, 0,25 ccm Fettextrakt, 0,1 ccm Aceton = 10 Einh. Progynon	Apparat Nr. 4 1 ccm R_{20}, 0,25 ccm Tributyrinlösung, 0,25 Fettextrakt, 0,1 ccm Aceton = 1 Einh. Progynon	
10	8,9	10,1	(14,8)	8,25	9,4	(14,6)
15	8,95	11,4	(21,8)	8,3	10,7	(21,5)
20	8,85	12,7	(29,4)	8,25	12,0	(29,2)
25	8,9	14,0	(36,3)	8,3	13,3	(36,0)
30	9,0	15,45	(43,8)	8,4	14,65	(43,0)
35	9,0	16,7	(50,5)	8,35	15,85	(49,5)
40	8,9	17,95	(58,0)	8,3	17,1	(57,0)
45	8,9	19,3	(65,5)	8,3	18,35	(64,0)
50	8,85	20,6	(73,0)	8,2	19,6	(71,0)
55	8,9	21,95	(80,0)	8,2	20,8	(77,5)
60	8,85	23,35	(87,0)	8,15	22,1	(84,5)
70	8,75	25,85	(102,5)	8,05	24,4	(98,5)
80	8,70	28,7	(118,0)	7,95	26,75	(112,0)

Über die Art der Hemmung der Fermentwirkung durch die Hormone.

Nachdem wir eine ausgesprochene Hemmungswirkung des Thyroxins auf die Lipasen festgestellt haben, mußten wir eine Erklärung für den inneren Mechanismus der Hormonwirkung auf die Fermente suchen. Nach *Michaelis* liegt der Fermentwirkung folgendes Schema zugrunde. Das Substrat, in unserem Falle das Fett, verbindet sich mit dem Ferment, der Lipase, zu einer Fermentsubstratverbindung. Diese Fermentsubstratverbindung zerfällt in die Spaltsubstanzen (Fettsäuren und Glycerin) und das Ferment wird wieder frei. Fügt man einen Hemmungskörper hinzu, so kann dieser an zwei Punkten angreifen. Einmal kann er sich selbst mit dem Ferment verbinden, er besitzt eine Affinität zu dem Ferment, oder er kann die Spaltungsgeschwindigkeit der Fermentsubstratverbindung herabsetzen. Welcher Hemmungsmechanismus liegt nun hier vor? Besitzen die Hormone eine Affinität zu den Fermenten oder vermindern sie die Spaltungsgeschwindigkeit der Fermentsubstratverbindung? Durch die Einführung des Begriffs des Hemmungskoeffizienten haben *Michaelis* und *Rona* eine einfache Methode angegeben, um diese Frage zu entscheiden. Ist v die Geschwindigkeit der Lipolyse ohne Hemmungskörper und v_1 die Geschwindigkeit der Spaltung mit Hemmungskörper, so ist der Hemmungskoeffizient $h = \frac{v - v_1}{v}$. Ist die Menge des Hemmungskörpers konstant und variiert man die Substratkonzentration, so ist h für alle Substratkonzentrationen unverändert, wenn der Hemmungskörper die Zerfalls-

geschwindigkeit der Fermentsubstratverbindung beeinflußt. Nimmt h mit fallender Substratkonzentration zu, so besitzt der Hemmungskörper eine Affinität zu dem Ferment. Auf weitere Einzelheiten kann hier nicht eingegangen werden, sie finden sich bei *Michaelis* und *Rona*.

Wir haben in unseren Versuchen wechselnde Mengen von Tributyrin mit einer konstanten Menge von Thyroxin = $^1/_{10}$ mg der Spaltung unterworfen. Da wir mit keiner reinen Lösung von Tributyrin arbeiten, sondern das Tributyrin nur in Emulsion anwenden können, sind die Versuche nur mit diesem Vorbehalt anzustellen. Wir geben die Protokolle unserer Versuchsanordnung wieder.

Versuch 23a. Ansatz: Je 0.8 ccm R_{20}, 0,1 ccm Fettextrakt + 0,1 ccm einer verdünnten Natronlaugelösung, entsprechend der Natronlaugemengen in dem Versuch mit Thyroxin + 0,5 ccm Tributyrinlösung mit wechselnden Mengen von Tributyrin.

Minuten	Apparat Nr. 3 1,5 ccm R_{20} Thermobarometer	Apparat Nr. 2 0,455 mg Tributyrinlösung	Apparat Nr. 1 56,8 mg Tributyrinlösung	Apparat Nr. 6 2,26 mg Tributyrinlösung	Apparat Nr. 5 11,32 mg Tributyrinlösung
5	4,5	5,5 (7,7)	8,7 (10,8)	10,6 (10,8)	8,85 (10,7)
10	4,7	6,35 (11,3)	10,7 (20,5)	12,5 (21,0)	10,8 (20,4)
15	4,7	6,85 (14,0)	12,7 (31,3)	14,1 (30,6)	12,75 (31,0)
20	4,7	7,15 (15,7)	14,75 (43,0)	15,5 (39,0)	14,8 (42,5)
25	4,85	7.5 (16,8)	16,9 (53,3)	16,8 (46,0)	16,9 (53,0)
30	5,0	7,8 (17,6)	19,15 (64,5)	18,0 (52,0)	19,05 (63,0)
35	5,0	7,95 (18,4)	21,2 (75,5)	18,85 (57,5)	21,0 (75,0)
40	5,1	8,15 (19,0)	23,4 (87,0)	19,7 (62,0)	23,05 (85,5)
45	5,25	8,35 (19,3)	25,55 (98,0)	20,45 (65,5)	25,05 (96,0)

Versuch 23b. Ansatz wie Versuch 23a, jedoch mit Zusatz von $^1/_{10}$ mg Thyroxin.

Minuten	Apparat Nr. 3	Apparat Nr. 2	Apparat Nr. 1	Apparat Nr. 6	Apparat Nr. 5
5	7,6	7,8 (5,25)	9,5 (8,9)	9,35 (7,2)	7,95 (8,0)
10	7,6	8,5 (9,1)	11,2 (18,1)	10,8 (15,9)	9,55 (16,8)
15	7,7	8,95 (11,0)	12,9 (26,8)	12,2 (23,7)	11,1 (24,8)
20	7,7	9,2 (12,4)	14,45 (35,0)	13,6 (32,0)	12,6 (33,0)
25	7,7	9,4 (13,5)	16,2 (44,5)	15,0 (40,5)	14,4 (43,0)
30	8,7	10,55 (14,3)	19,0 (54,0)	16,95 (46,0)	17,05 (52,0)
35	8,85	10,7 (14,3)	20,65 (62,5)	17,7 (50,0)	18,6 (60,0)
40	8,05	9,9 (14,3)	21,55 (71,5)	17,5 (53,5)	19,5 (69,0)
45	7,7	9,6 (14,6)	22,85 (80,5)	17,6 (56,0)	20,8 (78,0)

Aus diesen Werten ergibt sich für h aus v und v_1 nach 45 Minuten berechnet:

Konzentration des Tributyrins	$h = \frac{v - v_1}{v}$
$^1/_4$ m = 56,8 mg	0,09
$^1/_{20}$ m = 11,32 mg	0,10
$^1/_{100}$ m = 2,26 mg	0,13
$^1/_{500}$ m = 0,455 mg	0,35

Der Hemmungskoeffizient ist also nicht konstant, sondern nimmt mit fallender Substratkonzentration zu. Daraus folgt, daß der Hemmungskörper, in unserem Falle das Thyroxin, eine Affinität zu der Lipase besitzt. Die Hemmungswirkung ist also so zu erklären, daß das Thyroxin einen Teil des Ferments mit Beschlag belegt.

Untersuchungen über den Einfluß des Thyroxins auf die fermentative Fettsynthese.

Da die Lipasen im Organismus nicht nur die Aufgabe haben, Fette zu spalten, sondern ebenfalls die Fette aus ihren Spaltprodukten zu synthetisieren, war es von Wichtigkeit, die Wirkung des Thyroxins auf die fermentative Fettsynthese zu untersuchen. Leider steht uns bis heute kein ähnlich genaues Verfahren zur Bestimmung der Fettsynthese zur Verfügung, wie wir es für die Fettspaltung besitzen. Wir sind daher auf ziemlich unphysiologische Modellversuche angewiesen. Diese Tatsache muß berücksichtigt werden, wenn wir in unseren Syntheseversuchen keine Wirkung des Thyroxins auf die Geschwindigkeit der Fettsynthese beobachten konnten. Selbst in den größten Thyroxinkonzentrationen, die wir angewandt haben, 100 mg, konnten wir keine Beeinflussung feststellen. Es kommt hinzu, daß das Thyroxin in diesen Versuchen nicht in Lösung geht, so daß sehr wohl diese physikalisch-chemischen Umstände für das negative Resultat verantwortlich sein können. Diese Versuche wurden mit Ölsäure und Glycerin, mit hochwirksamem Pankreas- und Lebertrockenpulver, die nach *Willstätter* dargestellt wurden, angestellt. Über die technischen Einzelheiten siehe bei *Rona* und *Mühlbock*. Wir geben von mehreren Versuchen nur zwei Protokolle.

Syntheseversuch 1. Ansatz: 25 ccm Glycerin, 3 g Oleinsäure, 0,25 g Pankreastrockenpulver. Ein zweiter Ansatz mit genau den gleichen Mengen + 2 mg Thyroxin. Um die Geschwindigkeit der Synthese zu kontrollieren, werden in gleichen Zeiten je 3 ccm der Glycerinlösung gegen n/10 NaOH titriert. Die Abnahme der verbrauchten Natronlaugemenge gibt ein Maß für das Fortschreiten der Synthese.

Zeit	ohne Thyroxin	mit 2 mg Thyroxin
0 Std.	15,9	15,5
2 Std.	11,3	11,1
4 Std.	12,0	11,7
6 Std.	10,3	10,0

Syntheseversuch 2. Ansatz wie in Versuch 1, nur Zusatz von 100 mg Thyroxin. Die Lösungen werden wie in Versuch 1 während der Versuchsdauer in der Schüttelmaschine geschüttelt.

Zeit	ohne Thyroxin	mit 100 mg Thyroxin
0 Std.	15,0	15,5
2 Std.	11,7	11,5
4 Std.	7,9	8,2
6 Std.	6,3	6,4
26 Std.	4,9	4,8

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß die fermentative Synthese durch Thyroxin nicht beeinflußt wird.

Zusammenfassung.

Es werden die Wirkungen der verschiedensten Hormone auf die fettspaltenden Fermente untersucht.

Bei der Bestimmung mit der Tropfmethode von *Rona-Michaelis* ergab sich, daß von sämtlichen untersuchten Hormonen nur das Thyroxin eine deutliche Wirkung im Sinne einer Hemmung auf die Fettgewebslipase ausübt.

Eine geringe Hemmung der Lipolyse ist bei Zusatz von Präphyson nachweisbar. Die verschiedenen brunstauslösenden Ovarialhormone üben bei dieser Versuchsanordnung keinerlei Wirkung auf die Fettgewebslipase aus.

Die Lipasen der Placenta, des Pankreas und der Leber werden in gleicher Weise beeinflußt wie die Fettgewebslipase. Auch bei diesen Organlipasen zeigt nur das Thyroxin eine starke Wirkung im Sinne der Hemmung, das Präphyson eine schwächere Sämtliche anderen Hormone beeinflussen unter den im Tropfversuch gegebenen Bedingungen die Lipolyse nicht.

Die Serumlipase wird durch die verschiedensten Hormone in leichtem Grade gehemmt, nur Kallikrein zeigt eine außerordentlich starke Hemmungswirkung.

Bei den Untersuchungen der lipatischen Wirkung nach der Methode von *Warburg, Rona, Lasnitzki* ergab sich, daß die Grenzdosis der Wirkung des Thyroxins bei einer Verdünnung von $1 : 10^7$ liegt. Insulin und Progynon zeigten bei diesem Verfahren eine Wirkung auf die Fettgewebslipase in einer Verdünnung von $1 : 10^5$.

Die Beeinflussung der Lipase ist stets eine Hemmung. Eine Inversion der Wirkung bei Änderungen der Konzentrationen tritt nicht ein.

Durch die Bestimmung des Hemmungskoeffizienten nach *Michaelis-Rona* wird gezeigt, daß die Hemmung der Fermentwirkung für das Thyroxin in einer Affinität des Hormons zum Ferment zu suchen ist.

Die fermentative Fettsynthese läßt sich nicht durch Thyroxin beeinflussen.

Nachtrag bei der Korrektur. Während der Drucklegung der Arbeit hatten wir Gelegenheit, reines kristallisiertes Brunsthormon *Theelin*, das uns in wässeriger Lösung von *Parke, Davis & Co.* liebenswürdigerweise zur Verfügung gestellt wurde, zu prüfen. 1 ccm Theelinlösung = 50 Ratteneinheiten ergab im Tropfversuch keine Beeinflussung der Lipolyse. Bei der Bestimmung der Grenzkonzentration einer die Lipolyse hemmenden Wirkung des Theelins in der *Warburg*schen Apparatur fanden wir sehr erhebliche Abweichungen von dem mit der handelsüblichen Progynonlösung erhobenen Befund. Theelin zeigte eine Hemmung der Lipasen erst bei einer Konzentration von 125 Mäuseeinheiten, während von der Progynonlösung bereits eine Menge, die einer Mäuseeinheit entspricht, eine hemmende Wirkung ausübt. Daraus muß der Schluß gezogen werden, daß die Hemmung der Lipolyse bei Verwendung der im Handel befindlichen Brunsthormone *nicht eine Eigenschaft des brunstauslösenden Hormons, vielmehr auf Begleitstoffe zurückzuführen ist.* Die Trockensubstanzbestimmung ergab bei der verwandten reinen Theelinlösung unwägbare Mengen.

Weiterhin wurde von uns kristallisiertes Thyroxin von *Squibb* und *Sons* geprüft. Sowohl die Wirkung im Tropfversuch als die Bestimmung der wirksamen Grenzkonzentrationen ergab völlige Übereinstimmung mit den bisher verwandten Thyroxinpräparaten.

Literatur.

1) *Abderhalden* u. *Franke*, Fermentforschung **9**, 485, 1928. — 2) *Michaelis* u. *Rona*, diese Zeitschr. **60**, 62, 1914. — 3) *Rona* u. *Mühlbock*, ebendaselbst **223**, 130, 1930. — 4) *Rona* u. *Petow*, ebendaselbst **146**, 144, 1924. — 5) *Simon* u. *Weiner*, ebendaselbst **207**, 319, 1929. — 6) *Weil* u. *Landsberg*, ebendaselbst **207**, 186, 1929.

Lebenslauf

Der Verfasser, *Otto Mühlbock*, wurde am 4. Januar 1906 in Berlin als Sohn des Ingenieurs *Herrmann Mühlbock* geboren. Nach bestandenem Abiturium 1924 studierte ich an der Universität Berlin Chemie. Das chemische Studium schloß ich 1927 mit der Promotion zum Dr. phil. ab. Nach meinem chemischen Studium ließ ich mich in die Medizinische Fakultät einschreiben. Im Wintersemester 1931/32 legte ich das medizinische Staatsexamen ab. Während meines Studiums führte ich mit Unterstützung der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft an der Universitäts-Frauenklinik der Charité gemeinsam mit *C. Kaufmann* eine Reihe wissenschaftlicher Arbeiten über den Fettstoffwechsel des weiblichen Organismus durch. Im Sommersemester 1929 und im Wintersemester 1929/30 war ich wissenschaftlicher Assistent bei Prof. *Rona* in der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Charité. Die bisher veröffentlichten wissenschaftlichen Arbeiten sind folgende:

1. *O. Mühlbock*, Zur Kenntnis der Konstitution und der Derivate des Iso-Naphthyridins. Inaug.-Diss. Berlin 1927.

2. *C. Kaufmann* u. *O. Mühlbock*, Ovarialfunktion und Lipoidstoffwechsel. Arch. f. Gynäk. *134*, 603, 1928.

3. *C. Kaufmann* u. *O. Mühlbock*, Ovarialfunktion und Lipoidstoffwechsel. 2. Mitteilung. Arch. f. Gynäk. *136*, 478, 1928.

4. *C. Kaufmann* u. *O. Mühlbock*, Ovarialfunktion und Lipoidstoffwechsel. 3. Mitteilung. Arch. f. Gynäk. *139*, 478, 1929.

5. *O. Mühlbock*, Zum Stande unseres Wissens über Hormone. Jahresk. f. ärztl. Fortbild., Jan.-Heft 1930.

6. *C. Kaufmann* u. *O. Mühlbock*, Leberglykogen und menstrueller Zyklus. Klin. Wochenschr. *9*, 1170, 1930.

7. *P. Rona* u. *O. Mühlbock*, Über die fermentative Estersynthese. Biochem. Zeitschr. *223*, 130, 1930.

8. *O. Mühlbock* u. *C. Kaufmann*, Eine gravimetrische Cholesterin-Bestimmung für klinische Untersuchungszwecke. Klin. Wochenschr. *9*, 2019, 1930.

9. *C. Kaufmann* u. *O. Mühlbock*, Führt der Funktionsausfall der weiblichen Keimdrüse zur Cholesterinämie? Klin. Wochenschr. *10*, 696, 1931.

10. *O. Mühlbock* u. *C. Kaufmann*, Die gravimetrische Cholesterin-Bestimmung im Blut und Serum. Biochem. Zeitschr. *233*, 222, 1931.

11. *O. Mühlbock* u. *C. Kaufmann*, Eine Abänderung der Blut-Fettsäure-Bestimmung nach Bloor. Klin. Wochenschr. *10*, 1128, 1931.